

Efeito da associação de antagonistas no controle de *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* em plântulas de citros*

Edna P. da R. Amorim¹, Itamar, S. de Melo²

¹Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade-Universidade Federal de Alagoas, CEP 05.7075-000, Maceió, AL, Brasil.

²CNPMA/ EMBRAPA, CEP 13.820-000, Jaguariúna, SP, Brasil

* Parte da Tese de Doutorado da primeira autora defendida na UNESP, Botucatu, SP.

Aceito para publicação em: 27/04/99.

RESUMO

Amorim, E.P. da R., Melo, I.S. de. Efeito da associação de antagonistas no controle de *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* em plântulas de citros. *Summa Phytopathologica*, v. 25, p. 335-338, 1999.

O efeito da associação de três isolados de *Trichoderma* spp. e sete isolados de rizobactérias sobre estirpes de *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora*, foi avaliado através das variáveis: altura das plântulas, comprimento das raízes, massa da parte aérea e das raízes, número de plantas sobreviventes e nível de infestação do solo. Em casa-de-vegetação, raízes de plântulas de citros foram submetidas aos tratamentos: associação de isolados de *Trichoderma harzianum* e *T. koningii* (AT); suspensão de

isolados de rizobactérias - *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* (SR); e associação de rizobactérias com isolados de *Trichoderma* (ART). As plântulas foram transplantadas para substrato pré-infestado com isolados de *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora*. Os resultados mostraram que ART controlou as duas espécies de patógenos, enquanto SR foi suficiente para controlar *P. citrophthora*.

ABSTRACT

Amorim, E.P. da R., Melo, I.S. de. The role of antagonist association on the control of *Phytophthora parasitica* and *Phytophthora citrophthora* on seedlings of citros. *Summa Phytopathologica*, v. 25, p. 335-338, 1999.

The role of the association of Trichoderma spp. isolates and seven rhizobacteria isolates on Phytophthora parasitica and P. citrophthora was tested. The following variables were evaluated: seedlings height, root length, shoot and root dry weight, number of survival plants, and soil contamination level. Under greenhouse conditions, the seedling of Citrus sp. were treated with Trichoderma harzianum and T. koningii isolates (TA); suspension

of rhizobacteria - Pseudomonas putida, P. fluorescens, Bacillus subtilis and Pseudomonas fluorescens (RS); and association of rhizobacteria with Trichoderma isolates (RTA). The seedlings were transplanted to pre-infested substrates with Phytophthora parasitica and P. citrophthora isolates. The results showed that the treatment RTA controlled the two species of the pathogens. On the other hand, RS controlled only P. citrophthora.

Additional keywords: biocontrol, Trichoderma, rhizobacteria.

Entre as doenças que atacam os citros, destaca-se a podridão de raízes, causada por *Phytophthora* spp. No passado, essa doença teve pouca importância, pois a laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), utilizada como porta-enxerto, era resistente à doença (6). A podridão tornou-se relevante, com o advento da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*) e a inutilização da laranja azeda como porta-enxerto, motivo pelo qual a produção de plântulas de citros com alta qualidade fitossanitária passou a ser fundamental para o controle da doença (5). As práticas recomendadas para o controle da doença em viveiros incluem desde a desinfestação do solo com fumigantes, tratamento de sementes com fungicidas ou tratamento térmico, tratamento da água de irrigação com sulfato de cobre, até a aplicação dos fungicidas fosetyl-al ou metalaxyl (13). Essas medidas são antieconômicas, causam fitotoxidez, induzem o aparecimento de novas raças do patógeno e tem provocado o enfezamento das plântulas (16).

Para reduzir o efeito da aplicação de tais produtos, novas técnicas, como controle biológico com microrganismos antagonistas são alternativas viáveis, com menores riscos de fracasso e de contaminação (8).

Várias espécies de *Trichoderma* já foram relatadas como antagonistas a *Phytophthora*, inclusive *P. parasitica* Dastur. MAY (8) controlou *P. parasitica* pelo cultivo de isolados de *Trichoderma* em farinha de arroz e aplicação em substrato pré-inoculado. AMORIM (1) obteve o controle de *P. parasitica* e *P. citrophthora* (Smith & Smith) Leonian, através da inoculação de plântulas de citros com isolados de *T. harzianum* Rifai e *T. koningii* Oud.

O potencial de rizobactérias antagonistas a esses patógenos, foi comprovado, no Brasil, por AMORIM & MELO (2), ao inocularem plântulas de citros com vários isolados de *Pseudomonas fluorescens* Mig., *P. putida* (Trev.) Mig. e *Bacillus subtilis* Cohn.

A combinação de isolados biocontroladores tem sido sugerida como uma tentativa para aumentar o nível e a consistência do controle de fitopatógenos habitantes do solo, que pode ser 30% mais efetivo do que o tratamento com um único isolado antagonista, possivelmente por aumentar a colonização das raízes ou aumentar a barreira de proteção (7, 10, 9, 11). WELLER & COOK (17) verificaram que a combinação dos isolados 2-79 e 13-79 de *P. fluorescens* promoveu supressão de 50% da podridão do pé do trigo, causada por *Gaeumannomyces graminis* (Sacc) Oliver

& Von Arx var. *tritici* Walker, comparada ao tratamento com o isolado 2-79, que propiciou 25% de controle.

A atividade de biocontrole pode ser aumentada pela combinação de *T. koningii* com *Pseudomonas* spp. fluorescentes. DULLY et al. (4) obtiveram o controle da podridão do pé do trigo com o uso combinado de *T. koningii* e *Pseudomonas* spp. fluorescentes. A atividade combinada dos metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. com compostos antifúngicos produzidos pelos agentes bacterianos pode expandir o "expectrum" de patógenos a serem controlados.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial da associação de isolados de *Trichoderma* spp. com isolados de rizobactérias no tratamento de plântulas de citros para o controle da podridão de raízes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados três isolados de *Trichoderma* (T_{13} e T_9 - *T. harzianum*, e T_3 - *T. koningii*) e sete isolados de rizobactérias (OG- *Bacillus subtilis*, C1-1B e Sta. Bárbara - *Pseudomonas putida*; C1S/NA, C2-8C e RC2 - *Pseudomonas fluorescens*; RA2- *P. fluorescens*), procedentes, respectivamente, de iscas de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary e de solos de fazendas dos municípios de Campinas e Guairá (SP), antagonistas à *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* em plântulas de citros, testados previamente "in vitro" e "in vivo" por AMORIM & MELO (2).

Sementes de limoeiro cravo, oriundas da coleção do Departamento de Horticultura da UNESP-Botucatu-SP, foram pré-germinadas em bandejas contendo solo autoclavado e após germinarem foram transferidas para copos plásticos (500ml) com substrato esterilizado, composto por solo/areia/esterco de boi (2:1:1) inoculado com os isolados de *Phytophthora parasitica* (P_6) e *P. citrophthora* (P_{38} , P_{41} e P_{45}), através da técnica de aplicação de suspensão de inóculo no solo (50ml/vaso), obtido a partir do cultivo dos fungos em placas com meio V-8- $CaCO_3$ (Suco V-8 -200 ml, $CaCO_3$, 3g, Ágar- 15g, Água destilada-800ml), incubados por dez dias a 28°C, em regime de escuro contínuo, seguido da homogeneização com 200ml de água destilada esterilizada.

Os isolados de *Trichoderma* foram cultivados em BDA (Batata-dextrose-ágar), por 72 horas. Discos de 5mm de diâmetro foram

retirados das bordas de colônias de cada isolado e transferidos para frascos de erlenmeyer (250ml) com 100ml de farinha de arroz úmida e incubados a 28°C sob luz fluorescente, durante sete dias. Após esse período, dois gramas da mistura de *Trichoderma* foram colocados na porção mediana do copo, onde ficaria a maior concentração de radículas das plântulas.

Para obtenção dos isolados bacterianos, estes foram cultivados em meio NA (Nutriente ágar) por 48 horas, transferidos para placas com o mesmo meio e incubados por 72 horas. Células bacterianas de cada isolado foram suspensas em 4,5ml de solução salina 0.85% e as concentrações ajustadas para 10^5 ufc/ml, aferida em colorímetro, no comprimento de onda de 550 nm, para obtenção do valor de absorvância. As suspensões foram misturadas e agitadas por dois minutos. As raízes das plântulas foram imersas na suspensão por 30 minutos.

A avaliação foi realizada três meses após o transplante, efetuando-se a medida da altura das plantas, o comprimento das raízes, a matéria seca da parte aérea e da raiz, o número de plantas sobreviventes e a recuperação do patógeno, pelo teste de isca, idealizado por TSAO (15) e adaptado por MAY (8). O método consiste em uma diluição em série do solo infestado, ou seja, uma parte desse solo em duas partes de solo esterilizado, 1:4, 1:8, 1:16 até o ponto máximo de diluição, quando não se recupera mais o patógeno. Pedacinhos de folhas de citros foram utilizadas como iscas para recuperação de *Phytophthora*: 20 pedacinhos de folha (3mm²),

30ml de água e 5 gramas de solo para cada diluição. Quanto maior o ponto final de diluição maior o número de propágulos no solo. A presença de esporângios ao redor das iscas foi considerada resposta positiva (+) e a ausência, resposta negativa (-).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em arranjo fatorial, com doze tratamentos, constituídos pelos quatro isolados de *Phytophthora*, e três tipos de inóculo- suspensão de isolados rizobacterianos (SR), associação de isolados de *Trichoderma* (AT) e associação de rizobactérias com isolados de *Trichoderma* (ART), e quatro repetições, sendo cada parcela constituída por nove plântulas. As testemunhas foram inoculadas apenas com os isolados de *Phytophthora*. O mesmo delineamento experimental foi utilizado para o teste de recuperação do patógeno do solo e número de plantas sobreviventes.

Os dados originais da altura de planta, comprimento de raiz, matéria seca da parte aérea e da raiz, número de discos com esporângios e número de plantas sobreviventes foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, conforme PIMENTEL GOMES (12).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância da recuperação do patógeno e número de plantas sobreviventes estão contidos no Quadro 1.

Quadro 1. Recuperação de *Phytophthora* spp. do solo, pelo teste de isca e sobrevivência de plântulas de limoeiro cravo, após três meses de transplante.

Tratamento ¹	Nº de Discos c/ esporângios ^{2,3}				Nº de plantas sobreviventes ³			
	P ₄₁	P ₄₅	P ₉	P ₃₈	P ₄₁	P ₄₅	P ₉	P ₃₈
Testemunha	6,0 aC	7,0 aBC	8,0 aAB	9,0 aA	6,0 bA	5,0 cB	4,0 dC	4,0 dC
ART	0,0 bA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 d A	9,0 aA	9,0 aA	9,0 aA	9,0 aA
SR	0,0 bB	0,0 c B	2,0 b A	2,0 cA	9,0 aA	9,0 abA	8,0 bB	8,0 bB
AT	0,0 bC	2,0 bB	3,0 bAB	4,0 bA	9,0 a A	8,0 bB	7,0 cC	7,0 cC

¹ P₄₁, P₄₅, P₃₈ = *P. citrophthora*; P₉ = *P. parasitica*, ART = SR + AT; SR = suspensão de rizobactérias; AT = associação de isolados de *Trichoderma* spp.² Média de quatro repetições (10 discos avaliados). ³ Médias seguidas da mesma letra minúscula, no sentido vertical e médias seguidas da mesma letra maiúscula, no sentido horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

Comparando os resultados do Quadro 1 verifica-se que a associação de isolados rizobacterianos com isolados de *Trichoderma* (ART) destacou-se no controle de *P. parasitica* e *P. citrophthora*, uma vez que proporcionou a sobrevivência total das plântulas e ausência de esporângios no solo, embora não tenha diferido do tratamento com a suspensão de isolados rizobacterianos (SR), em relação aos isolados P₄₁ e P₄₅ de *P. citrophthora*.

As médias da altura de plantas, comprimento de raiz, matéria seca da parte aérea e da raiz (Figura 1) mostram que o tratamento ART foi o mais significativo, evidenciando maior quantidade de matéria seca da parte aérea e da raiz e altura de plantas em relação às testemunhas, excetuando-se o isolado P₄₅ e P₃₈ (*P. citrophthora*). Esses resultados revelam a possibilidade do uso de diferentes espécies, ou seja da interação microbiana, no controle de patógenos de raízes, tão questionada por fitopatologistas, mas tão pouco estudada, como observaram BOWEN & ROVIRA (3).

O uso combinado de isolados é uma tentativa, proposta por alguns pesquisadores, para melhorar o desempenho de um

tratamento de controle biológico. PIERSON & WELLER (11) sugeriram que a mistura de isolados, comparada ao uso de um único antagonico, pode resultar em uma comunidade da rizosfera mais estável, ampliando a diversidade de mecanismos de controle biológico, podendo suprimir vários patógenos. DULLY et al. (4), estudando a combinação de *T. koningii* com *Pseudomonas* spp. fluorescentes para o controle da podridão do pé do trigo, constataram a compatibilidade desses agentes quando aplicados simultaneamente. Nenhum dos isolados testados, nem a mistura dos isolados, reduziu a ação antagonica de *T. koningii*; alguns isolados até melhoraram a atividade do fungo. O desempenho de todos os tratamentos bacterianos foi gradualmente melhorado pela combinação com *T. koningii*.

Possivelmente, o aumento da atividade de biocontrole exercido pela combinação de *Trichoderma* spp. com *Pseudomonas* spp. fluorescentes se deva ao sítio de atuação das espécies que interagem na rizosfera. De acordo com Cramer & May (1972), citados por BOWEN & ROVIRA (3), interações de espécies são

pontos-chaves na consideração da população biológica da rizosfera. Microbiologistas tendem a considerar os organismos que coexistem sobre uma raiz como ocupantes de diferentes nichos, mas esses diferentes organismos podem estar ocupando o mesmo nicho, sítios vizinhos com propriedades idênticas ou diferentes partes da raiz.

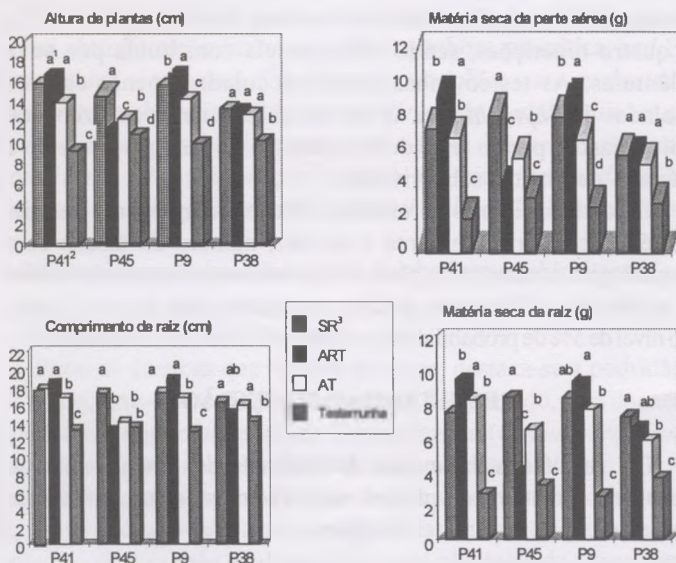


Figura 1 - Desenvolvimento de plântulas de limoeiro cravo em substrato infestado com isolados de *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* e com associação de antagonistas. ¹Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). ²P₄₁, P₄₅, P₃₈ = *Phytophthora citrophthora*, P₉ = *Phytophthora parasitica*. ³ART = SR + AT; SR = suspensão de rizobactérias; AT = associação de isolados de *Trichoderma* spp..

SUSLOW (14) cita que o posicionamento adequado do organismo antagonista é um importante mecanismo de antagonismo. Certas áreas da raiz, tais como junções de células, pontos de emergência de raízes laterais, ápice, etc. são favoráveis à colonização de muitos tipos de bactérias e fungos, devido à abundância de exsudatos de raízes (18).

O sucesso do presente trabalho, provavelmente, se deve à associação dos fatores citados acima, ou seja, aos diferentes sítios de colonização que os isolados bacterianos e os isolados de *Trichoderma* desenvolveram sobre o hospedeiro, atraídos pelos exsudatos liberados pelas suas raízes.

LITERATURA CITADA

01. AMORIM, E.P. da R. Controle Biológico de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* Dastur e *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith) Leonian em plântulas de citros. Botucatu, 1997. 111p. Tese (Doutorado) - Faculdade de

Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.
 02. AMORIM, E.P. da R., MELO, I.S. Controle biológico de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* Dastur e *Phytophthora citrophthora* (Smith of Smith) Leonian com rizobactérias. *Fitopatologia*, Brasília, v.22, p. 243, 1997.
 03. BOWEN, G.D., ROVIRA, A.D. Microbial colonization of plant roots. *Annual Review Phytopathology*, Palo Alto, v.14, p. 121-144, 1976.
 04. DULLY, B.R., SIMON, A., WELLER, D.M. Combination of *Trichoderma Koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. *Phytopathology*, St. Paul, v.86, p. 188-194, 1996.
 05. FEICHTENBERGER, E. Gomose dos citros. São Paulo: Instituto Biológico, 1986. 14 p.
 06. KIMATI, H., GALLI, F. Doenças dos citros. In: GALLI, F. (Coord.) *Manual de fitopatologia, doenças de plantas cultivadas*. 2 ed. São Paulo: Ceres, 1980. p. 213-235.
 07. LEMANCEAU, P., ALABOUVETTE, C. Biological control of *Fusarium* diseases by *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop protection*, Guildford, v.10, p. 279-286, 1991.
 08. MAY, L.L. Controle biológico, físico e químico de *Phytophthora parasitica* Dastur em plântulas de citros. Piracicaba, 1994. 89p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
 09. PAULITZ, T.C., AHMAD, J.S., BAKER, R. Integration of *Pythium nunn* and *Trichoderma harzianum* isolate T-95 for the biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. *Plant Soil*, Dordrecht, v. 121, p. 243-250, 1990.
 10. PARK, C.S., PAULITZ, T.C., BAKER, R. Biocontrol of *Fusarium* wilt cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *F. oxysporum*. *Phytopathology*, St. Paul, v.78, n. 2, p. 190-194, 1988.
 11. PIERSON, E.A., WELLER, D.M. Use of mixture of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology*, St. Paul, v. 84, p. 940-947, 1994.
 12. PIMENTEL GOMES, F. *Curso de Estatística Experimental*. Piracicaba: Nobel, 1985. 466 p.
 13. ROSSETTI, V. *Doenças dos citros*. São Paulo: Fundação Cargil, 1981. p.671-673.
 14. SUSLOW, T. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. In: MOUNT, M.S., LACY, G.L. *Phytopathogenic Prokaryotes*. New York: Academic Press, 1982. p. 187-223.
 15. TSAO, P.H. A serial dilution med-point method for estimating disease potentials of citrus *Phytophthoras* in soil. *Phytopathology*, St. Paul, v.50, p. 714-724, 1960.
 16. TUCKER, C.P.H., ANDERSON, C.A. Correction of citrus seedlings stunting on fumigated soil by phosphate application. *Proceedings of the Florida State Horticulturæ Society*, Winter Haven, v.85, p.10-12, 1972.
 17. WELLER, D.M., COOK, R.J. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, St. Paul, v.73, n.3, p. 463-469, 1983.
 18. WELLS, H.D. *Trichoderma* as a biocontrol agent. In: MUKERJI, K.G., GARG, K.L. *Biocontrol of plant disease*. Boca Raton: CRC Press, 1988. v.1, p. 71-82.